

细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒

Cell Cycle and Apoptosis Analysis Kit

使用说明书

◆货号及规格:

目录编号	包装规格
C204-01	50T

◆产品组成:

试剂盒组分	组分规格
染色缓冲液	25mL
碘化丙啶染色液(20×)	1.25mL
RNase A(50×)	0.5mL

◆储存条件: 2-8℃运输, -20℃避光保存, 有效期两年。

◆产品概述:

细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒是一种采用经典的碘化丙啶染色(Propidium Iodide staining)方法进行细胞周期与细胞凋亡分析。

碘化丙啶(Propidium Iodide,简称 PI 是一种双链 DNA 的荧光染料。碘化丙啶和双链 DNA 结合后可以产生荧光, 并且荧光强度和双链 DNA 的含量成正比。细胞内的 DNA 被碘化丙啶染色后, 可以用流式细胞仪对细胞进行 DNA 含量测定, 然后根据 DNA 含量的分布情况, 可以进行细胞周期和细胞凋亡分析。

细胞发生凋亡时, 由于胞浆和染色质浓缩、核碎裂, 产生凋亡小体, 使细胞的光散射性质发生变化。在细胞凋亡的早期, 细胞对前向角光散射的能力显著降低, 对侧向光散射的能力增加或没有变化。在细胞凋亡的晚期, 前向和侧向光散射的信号均降低。因此可通过流式细胞仪测定细胞光散射的变化观察细胞凋亡情况。

本试剂盒通常应用于培养的贴壁或悬浮细胞的细胞周期与细胞凋亡检测。如果用于组织的细胞周期与细胞凋亡检测, 则必须把组织消化成单细胞状态, 才可以进行检测。

本试剂盒足够检测 50 个样品, 每个样品的细胞数量可以为 10-100 万。

◆使用方法:

1. 细胞样品的准备: 细胞数量控制在 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个。

- 1) 贴壁细胞: 小心吸除细胞培养液, 用胰酶消化细胞, 制备成单细胞悬液。1000xg 离心 5min, 沉淀细胞, 弃上清, 用 1mL 预冷的 PBS 润洗细胞一次, 离心收集细胞。
- 2) 悬浮细胞: 1000xg 离心 5mi, 沉淀细胞, 小心吸除上清。加入 1mL 预冷的 PBS, 重悬细胞, 再次离心收集细胞。
- 3) 组织细胞: 将组织块用剪刀剪成尽量小的小块后, 用 0.25%的胰酶消化 0.5-1h, 经过 200-400 目筛网过滤得到单细胞悬液。1000xg 离心 5min, 沉淀细胞。加入约 1mL 预冷的 PBS, 重悬细胞, 再次离心沉淀细胞。如组织难以消化, 可加入适量胶原酶。

2. 细胞固定:

- 1) 细胞沉淀用 1mL 预冷的 70%乙醇轻轻混匀, 4℃固定 2h 以上或者过夜。然后 1000xg 左右离心 5min 沉淀细胞后, 小心吸除上清, 可以残留约 50uL 左右的 70%乙醇, 以避免吸走细胞。
- 2) 加入 1mL 预冷的 PBS 重悬。然后再次 1000xg 离心 5min 沉淀细胞。小心吸除上清, 可以残留约 50uL 左右的 PBS, 以避免吸走细胞。轻轻弹击离心管底以适当分散细胞, 避免细胞成团。
3. 碘化丙啶染色液的配制: 对于 1 个样品, 在 0.5mL 染色缓冲液中加入 25uL 碘化丙啶染色液(20x)和 10uL RNase A(50×), 混匀待用。其它数量的样品参考下表, 根据待检测样品的数量配制适量的碘化丙啶染色液:

名称	1 个样品	6 个样品	12 个样品
染色缓冲液	0.5mL	3mL	6mL
碘化丙啶染色液(20×)	25uL	150uL	300uL
RNase A(50×)	10uL	60uL	120uL
Final volume	0.535mL	3.21mL	6.42mL

注: 配制好的碘化丙啶染色液短时间内可以 4℃保存, 最好当日使用。

4. 染色:

每管细胞样品中加入 0.5ml 碘化丙啶染色液, 轻轻混匀重悬细胞沉淀, 37℃避光孵育 30 分钟, 就可以进行流式检测, 流式检测最好在 5h 内完成。

5. 流式检测和分析:

用流式细胞仪在激发波长 488m 波长处检测红色荧光, 同时检测光散射情况。采用适当分析软件进行细胞 DNA 含量分析和光散射分析。

◆注意事项:

1. 本试剂盒需要使用流式细胞仪进行检测：需自备 PBS 和 70%乙醇。
2. 细胞需轻柔处理，尽量避免人为损伤细胞。
3. 为防止不同批次细胞在实验时所处周期不同导致重复性差，可以在实验前进行细胞的同步化处理。实验细胞应处于对数生长期，贴壁细胞一般在 50-80%汇合度时收集为宜。
4. 400 目筛网过滤是用来将粘在一起的细胞团滤掉，留下单细胞，否则会出现人为的多倍体干扰。如果没有条件过滤，请在染色之前将细胞轻弹以分散，再进行染色。
5. 荧光染料均存在淬灭问题，保存和使用过程中请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。
6. 碘化丙啶对人体有刺激性，操作碘化丙啶时，应注意防护，保护眼睛、避免吸入。
7. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
8. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或药品等用途。

=====

